

## Apoptotic effects of silver nanoparticles coated with *Zataria multiflora* leaves extract on HepG2 cell line

Khorasani N<sup>1</sup>, Baharara J<sup>2\*</sup>, Iranbakhsh AR<sup>3</sup>, Ramezani T<sup>4</sup>

1- Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I. R. Iran.

2- Research Center for Animal Development Applied Biology and Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I. R. Iran.

3- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran.

4- Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I. R. Iran.

Received June 20, 2015; Accepted October 19, 2015

### Abstract:

**Background:** Silver nanoparticles (AgNPs) have antibacterial, anti-angiogenesis and anti-cancer activity. The purpose of this study was to examine the apoptotic effects of AgNPs coated with *Zataria multiflora* leaves extract on HepG2 liver cancer cells.

**Materials and Methods:** HepG2 cancer cell lines were treated with different concentrations of AgNPs for 24 and 48 hours. The viability of the cells and inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) were determined by the methylthiazol tetrazolium (MTT) assay. To evaluate the ability of AgNPs to induce apoptosis in HepG2 cells, the 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), acridine orange-propidium iodide staining and flow cytometry analysis for annexin V- propidium iodide were used.

**Results:** The results of the MTT assay showed that AgNPs decreased the proliferation of HepG2 cells in dose- and time-dependent manner. The  $IC_{50}$  during the incubation times of 24 and 48 hours were determined 40 and 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively ( $P<0.05$ ). The results of DAPI staining showed that AgNPs can lead to break down of nuclear DNA. Moreover, the acridine orange-propidium iodide staining and annexin V-propidium iodide showed that the percentage of apoptotic cells was increased in the treated cells.

**Conclusion:** Silver nanoparticles covered with *Z. multiflora* leaf extract have the ability to induce apoptosis in cancer cells HepG2 and they can be considered as a promising strategy for the treatment of liver cancer.

**Keywords:** Silver nanoparticles, Cancer, Apoptosis, *Zataria multiflora*

\* Corresponding Author.

Email: baharara78@gmail.com

Tel: 0098 513 843 7092

Fax: 0098 513 843 7092

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2016; Vol. 19, No 6, Pages 457-467

# بررسی اثرات آپوپتوتیک نانوذرات نقره پوشش‌دار شده با عصاره برگ آویشن شیرازی بر HepG2 رده سلولی

نگار خراسانی<sup>۱</sup>، جواد بهارآرا<sup>\*۲</sup>، علیرضا ایرانبخش<sup>۳</sup>، طبیه رمضانی<sup>۴</sup>

## خلاصه:

سابقه و هدف: نانوذرات نقره (AgNPs) دارای فعالیت ضد باکتری، ضد رگزایی و ضد سرطان می‌باشدند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات آپوپتوتیک AgNPs با پوشش عصاره برگ آویشن شیرازی بر سلول‌های سرطانی کبد، رده HepG2 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های سرطانی رده HepG2 با غلظت‌های مختلف AgNPs در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. میزان زیست‌پذیری سلول‌ها و غلظت مهاری ( $IC_{50}$ ) با آزمون MTT محاسبه شد. جهت بررسی القای آپوپتوز در سلول‌های HepG2 از روش‌های رنگ‌آمیزی DAPI. اکریدن اورنج-پروپیدیوم یدايد و آتالیز فلورسایتومری انکسین-۵-پروپیدیوم یدايد استفاده شد.

نتایج: یافته‌های حاصل از آزمون MTT نشان داد AgNPs به صورت وابسته به غلظت و زمان باعث کاهش تکثیر سلول‌های HepG2 می‌شود.  $IC_{50}$  در طی زمان‌های انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۴۰ و ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد ( $P < 0.05$ ). نتایج رنگ‌آمیزی DAPI نشان داد AgNPs می‌تواند منجر به شکسته شدن DNA هسته‌ای شود. هم‌چنین، رنگ‌آمیزی اکریدن اورنج-پروپیدیوم یدايد و آزمون انکسین-۵-پروپیدیوم یدايد نشان دهنده افزایش درصد سلول‌های آپوپتوز در سلول‌های تحت تیمار بود.

نتیجه‌گیری: پوشش داده شده با عصاره برگ آویشن شیرازی توانایی القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی HepG2 را دارد. استفاده از AgNPs می‌تواند به عنوان یک استراتژی امیدوار کننده در درمان سرطان کبد مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، سرطان، آپوپتوز، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)

دو ماهنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره نوزدهم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۴، صفحات ۴۵۷-۴۶۷

شش تغییر اساسی در فیزیولوژی سلول که در نهایت می‌تواند زمینه رشد سلول‌های بدخیم را فراهم کند به عنوان نشانه‌های تمام سرطان‌ها پذیرفته شده است که عبارتند از: ۱) خودکفایی در سیگنال رشد؛ ۲) عدم حساسیت به سیگنال‌های رشد؛ ۳) عدم محدودیت در هماندسانسازی؛ ۴) توانایی رگزایی؛ ۵) قابلیت متابولیزاسیون؛ ۶) مقاومت به آپوپتوز [۳]. باوجود درمان‌های مختلف مانند شیمی درمانی، ایمنی درمانی و رادیوتراپی درمان سرطان هنوز به عنوان یک چالش مهم مطرح است [۲]؛ بنابراین توسعه روش‌های مؤثر، زیست‌سازگار و کم هزینه برای درمان سرطان ضروری می‌باشد. آپوپتوز عبارت است از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، فرآیندی که در آن فعالیت‌های یک سلول در جهت تخریب خود سلول پیش می‌رود، که موجود زنده را قادر می‌سازد تا تعداد سلول‌های خود را حفظ کرده و سلول‌های ناخواسته که بقای موجود را تهدید می‌کنند، حذف نماید [۴،۵]. نقص در مکانیسم‌های فیزیولوژیکی آپوپتوز ممکن است منجر به ایجاد بیماری‌های مختلف مانند سرطان در انسان‌ها شود؛ در نتیجه امروزه بسیاری از استراتژی‌های درمانی بر اساس راه‌اندازی مجدد مرگ سلولی برنامه ریزی شده یا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی استوار است [۶] یکی از انواع سرطان‌هایی که امروزه درمان و توسعه آماری آن به یک چالش اساسی تبدیل شده است، سرطان کبد می‌باشد. بروز سرطان کبد در ۲۵ سال گذشته افزایش یافته است و انتظار می‌رود که در

## مقدمه

سرطان یکی از علل اصلی مرگ و میر در جهان است؛ در سال ۲۰۰۸ بیش از ۷/۶ میلیون نفر در سراسر جهان به علت ابتلا به سرطان فوت کرده‌اند. هم‌چنین، بروز سرطان به دلیل رشد جمعیت جهان و عوامل سرطان‌زا به طور مداوم در حال افزایش است [۱،۲]. سرطان رشد کنترل نشده سلول‌ها با توانایی حمله، متاستاز و گسترش به سلول‌های اطراف می‌باشد [۲].

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

<sup>۲</sup> استاد، گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

<sup>۳</sup> استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

<sup>۴</sup> دانشجوی دکترای تخصصی زیست شناسی تکوین جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی

**\*نشان نویسنده مسئول:** مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری

تلفن: ۰۵۱۳۸۴۳۷۰۹۲

پست الکترونیک: baharara78@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۴/۷/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۳۰

نقره کمک کنند [۱۷]. تاکنون بسیاری از انواع گیاهان، برای سترز نانوذرات نقره استفاده شده‌اند، مانند: گیاه مرزنجوش (*Gardenia jasminoide*)، گاردنیا (*Origanum Vulgare*)، عصاره میوه درخت جمبو با نام علمی (*Syzygium cumini*)، پلکترانتوس آمبینیکاس (*Plectranthus amboinicus*)، گیاه (*Salvia officinalis*) و مریم گلی (*Vitex negundo*) و یتکس [۱۸، ۱۹]. آویشن از جمله گیاهان دارویی است که بر مبنای اطلاعات حاصل از طب سنتی، اثرات درمانی گوناگونی را به آن نسبت می‌دهند. این اثرات شامل خواص ضد التهابی، ضد عفونی کننده، ضد سرفه، ضد اسپاسم، و خلط آور می‌باشدند [۲۰]. آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) گیاه بومی ایران و افغانستان و از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) می‌باشد. خانواده نعناعیان بیشترین پراکنده‌گی را در جهان دارند و تاکنون حدود ۵۰۰۰ گونه از آن معروف شده است [۲۱]. نعناعیان انواع ترکیب‌های ترپنئیدی و معطر را تولید می‌کنند و این ترکیبات را به طور عمده در غدد اپیدرمی، برگ‌ها، ساقه‌ها و اندام‌های زایشی ذخیره می‌کنند. ترکیبات اصلی تشکیل دهنده بخش‌های هوایی این گیاه شامل پاراسمین، گاما‌تریپن، کارواکرول و تیمول است. ترکیب عمده موجود در آویشن تیمول می‌باشد؛ این ترکیبات دارای گروه‌های عاملی فعال می‌باشدند که می‌توانند در بیوستتر نانوذرات نقش مهمی داشته باشند [۲۲]. Mata و همکاران اثرات سیتوکسیک *Abutilon* نانوذرات نقره سترز شده با عصاره آبی برگ گیاه *indicum* را در رده سلولی سرطانی COLO 205 (سرطان روده بزرگ انسان) در شرایط برون‌تنی بررسی کرده و مشاهده کردند که نانوذرات نقره به صورت وابسته به غلظت باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی رده COLO 205 می‌شوند. هم‌چنین، بیان کردند که در هسته سلول‌های تحت تیمار با نانوذرات نقره تغییرات موفولوژیکی مانند تراکم کروماتین‌ها و تغییرات در غشای سلول‌ها دیده می‌شود که این تغییرات در انتهای منجر به القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود [۲۳]. Zheng و همکاران به بررسی مکانیسم و نقش نانوذرات نقره و نانوذرات طلا در روند رشد سلول‌های سرطانی رده HepG2 در شرایط برون‌تنی پرداخته و دریافتند که هر دوی این نانوذرات باعث کاهش سلول‌های سرطانی رده HepG2 به صورت وابسته به غلظت می‌شوند، اما نانوذرات نقره دارای اثر مهاری قوی‌تری می‌باشند [۲۴]. Ortega و همکاران نیز به بررسی فعالیت ضد توموری نانوذرات نقره سترز شده توسط مخمر در رده‌های سلولی سرطان پستان MCF-7 و T-47D و همین‌طور سلول‌های نرمال پستان رده MCF10-A پرداختند. نتایج بررسی سمیت سلولی و آزمون MTT در هر دو رده سلولی

۱۰ تا ۲۰ سال آینده دو برابر شود [۷]. سرطان کبد در بین مردان پنجمین و در بین زنان هفتمین سرطان شایع می‌باشد [۸]. چون این نوع سرطان در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود، درمان‌های موجود برای بیماران مبتلا بسیار محدود است [۹]. ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر، نانوذرات نامیده می‌شوند. ویژگی نانوذرات در واکنش پذیری بیشتر آنها در مقایسه با ذرات دارای اندازه‌های بزرگتر است؛ هم‌چنین، نانوذرات از نظر شیمیایی و فیزیکی خصوصیات منحصر به‌فردی دارند که منجر به خواص مغناطیسی، الکتریکی، نوری و مکانیکی پیشرفته آن‌ها در مقایسه با مواد با اندازه بزرگتر می‌شود [۱۰، ۱۱]. تحقیقات در زمینه نانوفناوری به دلیل خواص منحصر به‌فرشان به سرعت در حال رشد می‌باشد و استفاده از آن‌ها در طیف گسترده‌ای از برنامه‌های کاربردی در علوم مختلف مانند علوم زیستی، شیمیایی و صنعتی رو به گسترش می‌باشد [۱۲]. نقش نانوذرات برای استفاده در تشخیص، درمان سرطان و نیز طراحی سیستم‌های دارویسانی پیشرفته رو به افزایش است [۱۳]. نانوذرات می‌توانند یک جایگزین بالقوه برای درمان بیماری‌ها باشند [۱۴]. از جمله مهم‌ترین و پرکاربردترین این مواد، نانوذرات نقره می‌باشند [۱۱]. در حال حاضر اعتقاد بر این است که نانوذرات نقره می‌توانند به عنوان یک عامل درمانی، علاوه بر استفاده در مبارزه با باکتری‌ها و اثر روی بهبود زخم، برای مبارزه با ایدز، ویروس‌ها و به خصوص سرطان نیز به کار بrede شوند [۱۵]. اخیراً، استفاده از نانوذرات نقره به عنوان یک عامل ضد سرطان امیدوار کننده مورد توجه قرار گرفته است [۱]. مطالعات نشان داده است که نانوذرات نقره می‌توانند باعث ایجاد آپوپتوز از طريق آزادسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در شرایط آزمایشگاهی شوند، هم‌چنین، اثرات ضد توموری، ضد تکثیری و اثرات ضد رگزایی آنها در شرایط آزمایشگاهی نیز بررسی شده است [۱۶]. نانوذرات را می‌توان با روش‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی به دست آورد، اما در بین این روش‌ها سترز نانوذرات با روش‌های زیستی به علت سازگاری با محیط زیست و نیز جنبه‌های اقتصادی آن، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. برای تولید نانوذرات به روش زیستی می‌توان از گیاهان، جلبک‌ها، قارچ‌ها، مخمر، باکتری‌ها و ویروس‌ها استفاده کرد [۲]. در میان منابع مختلف طبیعی، گیاهان و فرآورده‌های گیاهی بسیاری در دسترس هستند و می‌توان به راحتی از آن‌ها برای تسهیل در سترز نانوذرات استفاده کرد، عصاره آبی برگ گیاهان شامل آلkalوئیدها، تانن، استروئیدها، فتل، ساپونین و فلاونوئیدها می‌باشد و بر اساس این ترکیبات موجود در عصاره انتظار داریم که پروتئین، پلی‌ساقارید و یا متabolیت‌های ثانویه حاصل از عصاره برگ بتواند به کاهش یون نقره به شکل نانوذرات

به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. سپس، عصاره گیاهی با کاغذ صافی و اتمن شماره یک صاف شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

#### ستز نانوذرات نقره

برای ستز نانوذرات نقره نمک نیترات نقره (Sigma-Sigma-Aldrich, USA) با غلظت ۵ میلی مولار با ۱۰۰ میلی لیتر از عصاره مخلوط شد. تغییر رنگ محلول از زرد کمرنگ به قهوه ای pH=۷ تیره نشان دهنده تولید و ستز نانوذرات بود. این فرآیند در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد انجام شد.

روش های شناسایی نانوذرات نقره  
تغییرات رنگ نمونه ها به صورت عینی ملاحظه گردید و طیف جذبی نمونه ها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (Biotech EPOCH, US) در دامنه ای بین ۴۰۰-۷۰۰ نانومتر اندازه گیری گردید. هم چنین، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (CM-120, Philips) شکل و ابعاد نانوذرات ستز شده شناسایی شد. و از آزمون طیف سنجی مادون قرمز Fourier Transform Infrared: FT-IR برای بررسی پوشش سطحی نانوذرات نقره استفاده گردید. به علاوه، از روش تفرق دینامیک نور (Dynamic Light Scattering: DLS) برای تعیین اندازه نانوذرات ستز شده استفاده شد.

روش MTT  
روش MTT یکی از نمک های ترازو لیوم به رنگ زرد محلول در آب است که به وسیله دهیدروژئنаз های موجود در میتوکندری های فعال سلولی احیا می شود و سپس به شکل کربیتال های فورمازان و غیر محلول در آب، در سلول های زنده رسوب می نماید؛ این کربیتال ها به رنگ بنفس هستند و میزان رنگ بنفش آن مناسب با فعالیت سلولی و تعداد سلول های زنده می باشد [۲۷]. برای انجام این آزمون، ابتدا در حدود  $10^4 \times 5$  عدد سلول (بعد از شمارش توسط رنگ آمیزی تریپان بلو) در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. سپس، با غلظت های ۶۰ و ۴۰، ۳۰، ۲۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از نانوذرات نقره پوشش داده شده با عصاره آبی گیاه آویشن شیرازی در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند و پس از طی زمان های مذکور به هر خانه پلیت ۲۰ میکرو لیتر MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت درون انکوپیتور قرار گرفت. سپس، به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO (Merck, Germany) اضافه شد. در نهایت پس از

سرطانی که تحت تیمار با نانوذرات نقره قرار داشتند نشان دهنده کاهش وابسته به غلظت در تعداد سلول ها بود، اما نانوذرات نقره اثر قابل توجهی در مهار رشد سلول های نرم الاله در سلول های مورد می توان به خاطر فعالیت درون سلولی بالاتر در سلول های سلطانی در مقایسه با سلول های نرم الاله باشد [۲۵]. Vasanth همکاران به بررسی فعالیت ضد سلطانی و توانایی القاء آپوپتوز نانوذرات نقره ستز شده با عصاره پوست ساقه گیاه Moringa oleifera بر روی سلول های سلطان گردن رحم انسان (Hela) پرداختند و مشاهده نمودند که درصد سلول های آپوپتویک در سلول های تحت تیمار با نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل افزایش دارد [۲۶]. با توجه به کاستی هایی که در درمان سلطان کبد وجود دارد، نرخ رشد سریع این نوع سرطان و عدم تشخیص به موقع که سبب محدود شدن روش های درمانی می شود و وجود شواهدی مبنی بر دارا بودن خاصیت ضد سلطانی، ضد تکثیری و آپوپتوزی نانوذرات نقره و از آنجایی که تاکنون اثر نانوذرات نقره پوشش شده با گیاه آویشن شیرازی بر رده سلولی HepG2 مورد بررسی قرار نگرفته است، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات آپوپتویکی و ضد تکثیری نانوذرات نقره پوشش داده شده با عصاره آبی برگ گیاه آویشن شیرازی بر سلول های سلطانی کبد Rde HepG2 می باشد.

#### مواد و روش ها

##### تهیه و کشت سلول های رده HepG2

رده سلولی HepG2 از انتستیتو پاستور ایران، تهران تهیه شد و در محیط کشت کامل، شامل محیط کشت Bio (DMEM) (Idea, Iran) حاوی ۱۰ درصد FBS (Gibco, USA) و نیز یک درصد آنتی بیوتیک استرپتومایسین-پنی سیلین (Gibco, USA) درون فلاسک های مخصوص کشت سلولی، کشت داده شد و در انکوپیتور CO<sub>2</sub> دار ۹۵٪ درصد، و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد) نگهداری گردید.

#### تهیه عصاره گیاهی

گیاه آویشن شیرازی (Zataria multiflora) در هر با ریوم دانشگاه فردوسی مشهد (با کد هریاریومی ۳۵۳۱۴) شناسایی شد. برای تهیه عصاره گیاهی، جهت ستز نانوذرات نقره نمونه های گیاهی، با آب مقطر شست و شو داده شدند و به مدت یک هفته در دمای محیط خشک شده و سپس پودر شدند. برای تهیه عصاره های آبی مقدار ۵ گرم از پودر گیاهی توزین شده، پس از حل کردن در ۱۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر، بر روی هات پلیت قرار داده شد و

فلورست مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمون انکسین ۵-پروپیدیوم یداید جهت سنجش آپوپتوز یکی از بیومارکهای فرآیند آپوپتوز، نفوذ فسفاتیدیل سرین از غشاء داخلی به غشاء خارجی پلاسمای باشد [۳۳]. زمانی که فسفاتیدیل سرین در سطح سلول قرار گیرد، می‌تواند به وسیله رنگ آمیزی فلورست که با انکسین ۵ متصل می‌شود ردیابی گردد. لازم به ذکر است که از انکسین ۵ برای تشخیص فسفاتیدیل سرین موجود در غشاء خارجی سلول استفاده می‌شود، در حالی که از ترکیب انکسین ۵-پروپیدیوم یداید برای تمایز بین سلول‌های آپوپتویک و نکروتیک استفاده می‌شود. جهت انجام این آزمون از کیت انکسین ۵-پروپیدیوم یداید (Abcam, Germany) استفاده شد؛ بدین صورت که ابتدا رده سلولی HepG2 در پلیت ۶ خانه کشت داده شد. بعد از گذشت زمان مناسب از کشت سلول‌ها و چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت سلول‌ها با غلظت ۴۰ میکروگرم بر لیتر (غلظت  $IC_{50}$  در زمان ۲۴ ساعت) از نانوذرات نقره پوشش داده شده با عصاره آبی برگ گیاه آویشن شیرازی تیمار شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار، سلول‌ها از کف پلیت جدا شده و به درون اپندروف منتقل شدند و سپس سانتریفیوژ (۲۰۰۰ RPM) به مدت ۵ دقیقه انجام شد. با حذف کردن محیط رویی، به هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر Binding Buffer 1X اضافه شد و سپس ۵ میکرولیتر انکسین ۵ و ۵ میکرولیتر پروپیدیوم یداید به هر نمونه اضافه گردید. سپس، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شده و با دستگاه فلوسیتمتر (BD, USA) بررسی شدند.

### روش آماری

داده‌های کمی توسط نرم‌افزار SPSS و به کمک آزمون-های آماری ANOVA و Tukey در سطح معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) تجزیه و تحلیل شدند.

### نتایج

تولید نانوذرات در حدود ۴۰ دقیقه بعد از مخلوط کردن محلول نیترات نقره با عصاره آبی برگ گیاه شروع شد و بعد از گذشت ۴ ساعت فرآیند سنتز نانوذرات نقره کامل شد. این فرآیند در  $pH=7$  انجام شد. دمای مناسب برای سنتز نانوذرات نقره درجه سانتی‌گراد بود. نتایج مشاهدات عینی نشان دهنده تغییر رنگ محلول از زرد کمرنگ به سمت قهوه‌ای تیره بود که نشانه‌ای برای سنتز نانوذرات می‌باشد. نتایج UV-VIS حاصل از واکنش کاوش یون‌های نقره در محلول نشان داد که نانوذرات نقره سنتز

گذشت ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، میزان جذب نوری پلیت توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Epoch, BioTek, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد [۲۸]. هم‌چنین، غلظت مهاری (IC<sub>50</sub>) نیز تعیین شد. جهت حصول نتیجه بهتر و اطمینان از صحت نتایج بدست آمده، هر کدام از آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند. درصد سلول‌های زنده طبق فرمول زیر محاسبه گردید:  $100 \times (\text{میانگین جذب نمونه کنترل} / \text{میانگین جذب نمونه تیمار}) =$  درصد سلول‌های زنده

### رنگ آمیزی هسته‌ای DAPI

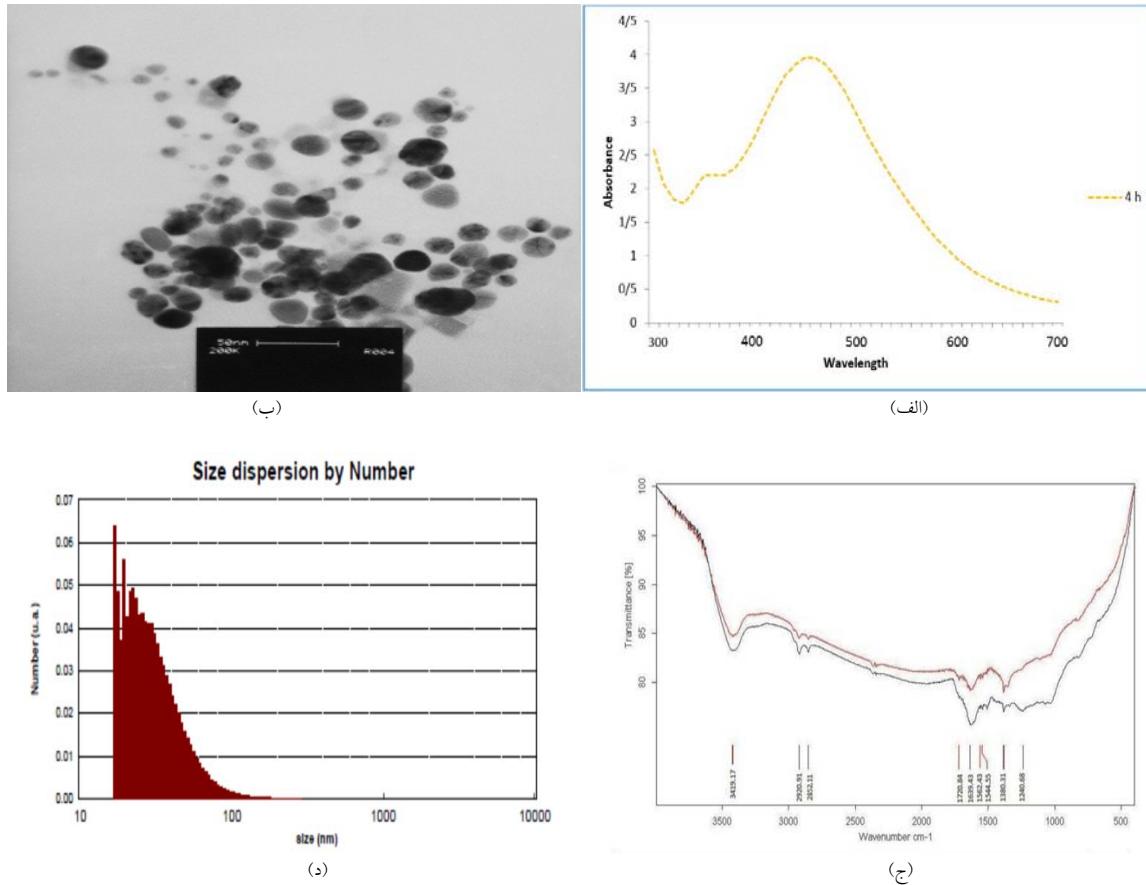
یک رنگ فلورست است که با قدرت به نواحی غنی از آدنین-تیمین در DNA متصل می‌شود [۲۹]. به وسیله این رنگ می‌توان سلول‌ها را از نظر مورفولوژی بررسی کرد. برای بررسی تأثیر نانوذرات نقره پوشش داده شده با گیاه آویشن شیرازی بر روی رده سلولی HepG2 سلول‌ها بعد از کشت بر روی لام‌های کوت شده با کلاژن در یک پلیت ۶ خانه با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (غلظت  $IC_{50}$  در زمان ۲۴ ساعت) از نانوذرات نقره تیمار شدند. سپس، به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از طی این زمان، سلول‌ها با پارافرم الالئید ۴ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق ثابت شدند و در نهایت سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق تحت اثر رنگ DAPI قرار داده شدند و سپس تغییرات ایجاد شده در مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ فلورست (Biomed, Korea) بررسی گردید [۳۰].

### رنگ آمیزی اکریدین اورنج-پروپیدیوم یداید

این روش به منظور بررسی تغییرات هسته سلول‌ها صورت می‌گیرد. در این روش هسته سلول‌های سالم به رنگ سبز می‌باشد، در حالی که هسته سلول‌های آپوپتویک اولیه به رنگ زرد تا نارنجی کمرنگ، هسته سلول‌هایی که چهار آپوپتوز شده‌اند به رنگ نارنجی تیره و هسته سلول‌هایی که چهار نکروز شده‌اند به رنگ قرمز تبدیل می‌شود [۳۱، ۳۲]. بنابراین از این روش به منظور تعیین نوع مرگ سلولی استفاده می‌شود. برای انجام این تست ابتدا سلول‌ها در یک پلیت ۶ خانه کشت داده شدند و سپس با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (غلظت  $IC_{50}$  در زمان ۲۴ ساعت) از نانوذرات نقره پوشش شده با گیاه آویشن شیرازی تیمار شده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس، سلول‌ها با تریپسین جدا شدند و رنگ‌های اکریدین اورنج (Sigma, France) و پروپیدیوم یداید (Sigma, France) با نسبت مساوی (۱۰ میکرو‌لیتر) به سوپانسیون سلولی اضافه گردید و با میکروسکوپ

ذرات نقره الگویی مشابه با طیف حاصل از عصاره گیاهی دارد که این امر نشان می‌دهد عصاره گیاهی به خوبی سطح نانوذرات را پوشش داده است. همچنین، نتایج روش تفرق دینامیک نور (DLS) نشان داد که نانوذرات نقره دارای اندازه‌هایی از حدود ۱۶ تا ۷۰ نانومتر با اندازه متوسط ۳۰ نانومتر هستند (شکل شماره ۱).

شده دارای یک حداکثر جذب در طول موج ۴۴۰ نانومتر می‌باشد. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM نیز نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره آبی آویشن شیرازی اشکال مختلفی از جمله کروی و پنج وجهی دارند، اما اکثر ذرات سنتز شده به پنج وجهی شباهت داشتند. مطالعات طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR) نشان داد که پوشش سطحی نانو



شكل شماره ۱- نتایج سنتز نانوذرات نقره. الف- نتایج طیف سنجی نور مرئی فرابنفش بعد از گذشت ۴ ساعت، ب- عکس میکروسکوپ الکترونی گذاره از نانوذرات نقره سنتز شده با گیاه آویشن شیرازی، ج- نتایج حاصل از طیف سنجی مادون قرمز؛ طیف مربوط به نانوذرات نقره با رنگ سیاه و طیف مربوط به عصاره آویشن با رنگ قهوه‌ای مشخص شده است، د- نتایج DLS: نحوه توزیع اندازه ذرات نانوذرات نقره سنتز شده

سرطانی رده HepG2، توسط نانوذات نقره نشان داد (نمودار شماره ۱).

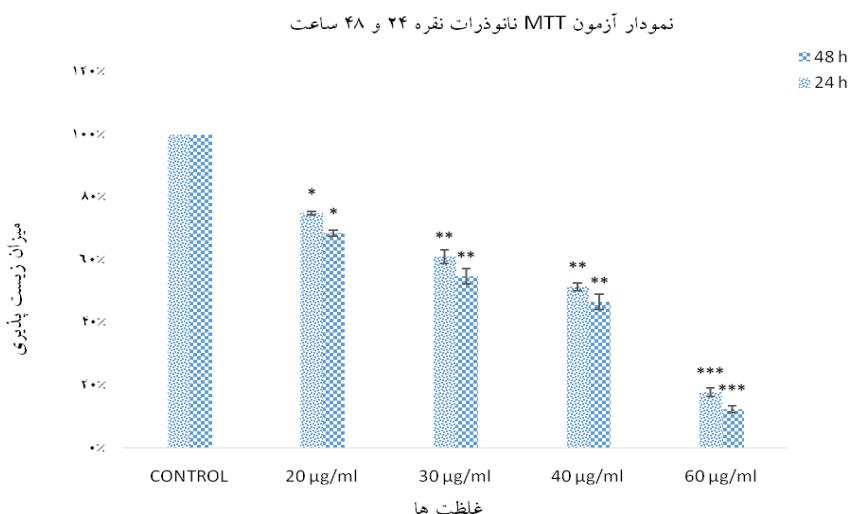
رنگ آمیزی DAPI جهت بررسی آپوپتوز نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که در سلول‌های HepG2 پس از تیمار با نانوذرات نقره پوشش داده شده توسط عصاره آبی برگ گیاه آویشن شیرازی با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بعد از گذشت ۲۴ ساعت هسته‌ها قطعه شده‌اند. شکل هسته‌ها از حالت نرمال (چند وجهی) خارج شده و گرد شدند که بیان‌گر وقوع آبیوتوزیس در این سلول‌ها بود. همچنین،

## میررسی میزان سمت سلولی یا آزمون MTT

به منظور بررسی اثرات نانوذرات نقره با پوشش عصاره برگ‌های گیاه آویشن شیرازی بر روی رشد و تکثیر سلول‌های MTT رده سلولی HepG2 از روش رنگ-ستجی سرطانی استفاده شد. نتایج حاصل از آزمون MTT به صورت میزان بقای سلولی و IC<sub>50</sub> گزارش گردید. با تعیین غلظت مهاری IC<sub>50</sub> مشخص شد که غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر در ۲۴ ساعت و غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر در ۴۸ ساعت منجر به مرگ درصد از سلول‌ها شده است. نتایج حاصل از آزمون MTT مهار قوی به صورت واپسیه غلظت و زمان را در تکثیر سلول‌های

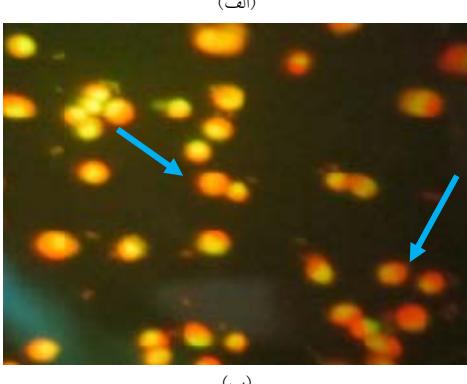
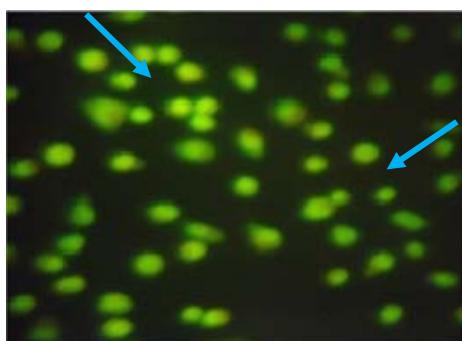
تغییرات مورفولوژیکی نشان دهنده آسیب سلولی پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار با نانوذرات نقره بود (شکل شماره ۲).

بررسی تغییرات مورفولوژیک نشان داد که برخی از سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره فشردگی کروماتینی و همچنین قطعه قطعه شدن کروماتینی قابل توجهی را دارا می‌باشند که این



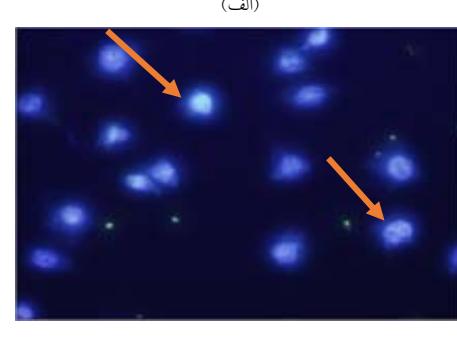
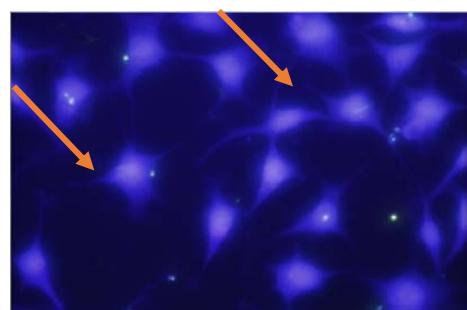
نمودار شماره ۱ - مقایسه میانگین درصد زنده ماندن نمونه کنترل در مقایسه با نمونه‌های تحت تیمار با نانوذرات نقره پوشش‌دار شده با گیاه آویشن در غلظت‌های مختلف ( $P<0.05$ ) ( $P<0.01$ ) ( $P<0.001$ )

گیاه آویشن شیرازی با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بعد از گذشت ۲۴ ساعت دچار آپوپتوز شده‌اند (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳- رنگ آمیزی اکریدین اورنج-پروپیدیوم یدايد  
(درشت نمایی X ۴۰۰)

الف- گروه کنترل؛ فلش‌ها سلول‌های سالم را نشان می‌دهند، ب- سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره؛ فلش‌ها الای مرگ سلولی توسط نانوذرات نقره را نشان می‌دهند.



شکل شماره ۲- رنگ آمیزی DAPI (درشت نمایی X ۴۰۰)  
الف- گروه کنترل؛ فلش‌ها سلول‌های سالم را نشان می‌دهند، ب- سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره؛ فلش‌ها سلول‌های قطعه قطعه شده را نشان می‌دهند.

رنگ آمیزی اکریدین اورنج-پروپیدیوم یدايد  
بررسی نتایج حاصل از این تست نشان داد که سلول‌های HepG2 پس از تیمار با نانوذرات نقره پوشش شده توسط عصاره

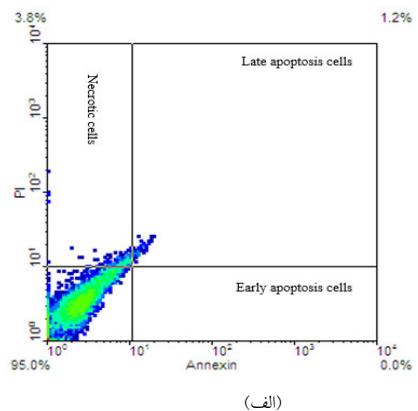
## بحث

در این پژوهش تجربی نانوذرات نقره با پوشش عصاره برگ‌های گیاه آویشن شیرازی تولید گردید. عصاره برگ‌های گیاه آویشن شیرازی غنی از ترکیبات فنولی است که در کاهش یون‌های نقره مؤثر می‌باشد. همچنین، این عصاره به عنوان عامل پوشش دهنده و پایدار کننده نانوذرات نقره عمل می‌کند. در نهایت اثر این نانوذرات بر میزان بقای سلول‌ها و همچنین توانایی القای آپوپتوز این نانوذرات در سلول‌های سرطانی رده HepG2 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی‌های حاصل از آزمون MTT نشان داد که این نانوذرات می‌توانند به صورت واپسی به غلظت و زمان منجر به کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها شوند. با محاسبه IC<sub>50</sub> مشخص شد که غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت و غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت منجر به مرگ ۵۰ درصد از سلول‌ها شده است. موضوع دیگری که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت بررسی توانایی ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی رده HepG2 توسط نانوذرات نقره بود. آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یک مکانیسم بسیار مهم برای همه موجودات زنده پرسلولی جهت کنترل تکثیر سلول‌ها، حفظ هموستانز طبیعی بدن و نیز فرآیندی برای از بین بردن سلول‌های مضر و غیر ضروری می‌باشد. سلول‌هایی که دچار مرگ آپوپتوزی می‌شوند تغییرات مورفو‌لوزیکی متعددی از خود نشان می‌دهند؛ از جمله: کوچک و جمع شدن سلول، انقباض سلولی، از دست دادن چسبندگی به ماتریکس خارج سلولی، تراکم کروماتین‌ها، از هم گسیختگی هسته و قطعه قطعه شدن هسته. به همین دلیل در سال‌های اخیر توجه زیادی به داروها یا روش‌هایی که بتوانند سیگنالیک آپوپتوز را به سلول‌های سرطانی برگرداند و آن‌ها را از بین ببرد، شده است [۶]. در این پژوهش برای بررسی تغییرات مورفو‌لوزیک هسته به منظور بررسی توانایی نانوذرات نقره در القای آپوپتوز از رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، توانایی القای آپوپتوز را در سلول‌های تیمار شده دارند؛ به نحوی که قطعه قطعه شدن هسته‌ها در نمونه‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل به خوبی مشخص بود. همچنین، در این مطالعه برای تعیین نوع مرگ سلولی القاء شده توسط نانوذرات نقره از روش رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج-اتیدیوم برماید استفاده شد. اکریدین اورنج تنها به سلول‌های زنده نفوذ می‌کند و هسته این سلول‌ها را به رنگ سبز در می‌آورد، در حالی که اتیدیوم برماید فقط جذب سلول‌هایی که استحکام غشای خود را از دست داده باشند شده و هسته این سلول‌ها را نارنجی تا قرمز رنگ می-

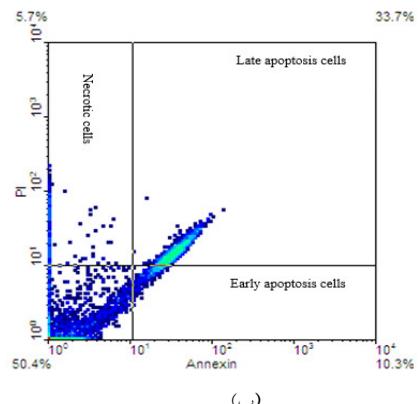
همان‌طور که در تصاویر هم مشخص می‌باشد در گروه کنترل تمامی هسته‌ها به رنگ سبز می‌باشند که نشانه سالم و زنده بودن سلول‌ها می‌باشد، درحالی که در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره پوشش شده توسط عصاره گیاه آویشن شیرازی شاهد تغییر رنگ هسته سلول‌ها از رنگ سبز به سمت رنگ‌های زرد، نارنجی و نارنجی تیره هستیم که این تغییرات رنگ نشانه‌ای برای القای مرگ سلولی در سلول‌های تحت تیمار می‌باشد.

## آزمون انکسین-۵-پروپیدیوم یداید

بررسی نتایج آزمون انکسین-۵-پروپیدیوم یداید نشان داد در حدود ۹۵ درصد زنده بودن سلول‌های گروه کنترل در حدود ۹۵ درصد می‌باشد، این درصد در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه آویشن شیرازی با غلظت ۴۰ میکروگرم بر لیتر و بعد از گذشت ۲۴ ساعت به ۵۰ درصد کاهش یافته است. در سلول‌های تحت تیمار در حدود ۳۴ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوز ثانویه شده بودند، در حدود ۱۰ درصد سلول‌ها در حال آپوپتوز اولیه بودند و در حدود ۵ درصد سلول‌ها دچار مرگ نکروتیک شده بودند (نمودار شماره ۲).



(الف)



(ب)

## نمودار شماره ۲ - نتایج آزمون Annexin V-FITC

الف- گروه کنترل؛ در حدود ۹۵ درصد سلول‌ها زنده و سالم می‌باشند، ب- سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره؛ همان‌طور که مشاهد می‌شود در حدود ۳۴ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوز ثانویه شده‌اند.

Govender و همکاران اثرات نانوذرات نقره سنتز شده توسط گیاه *Albizia adianthifolia* را بر القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان ریه رده A549 بررسی کردند. نتایج بررسی آنها نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده موجب کاهش زنده ماندن سلول‌ها (به صورت وابسته به غلظت) و افزایش میزان آپوپتوز از طریق مسیر درونی (میتوکندری) می‌شوند [۱]. Çiftçi و همکاران به مطالعه بررسی اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوزی نانوذرات نقره در رده سلولی 7 MCF-7 پرداختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که نانوذرات نقره بر روی زنده ماندن و بقای سلول‌ها به صورت وابسته به غلظت اثر قابل توجه دارند. همچنین، نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذرات نقره باعث ایجاد آپوپتوز و نکروز در سلول‌های مذکور می‌شوند [۳۶]. Hekmat و همکاران اثرات ضد تکثیری نانوذرات نقره را بر علیه رده‌های سلولی T-47D و MCF7 بررسی کردند. در این پژوهش برای بررسی تغییرات مورفوЛОژیکی و نیز بررسی روند آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره از روش رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. مشاهده هسته‌های قطعه شده نشانه‌ای برای وقوع آپوپتوز در این سلول‌ها بود. همچنین، برای تعیین نوع مرگ سلولی و محاسبه تعداد سلول‌های که دچار مرگ آپوپتویک و مرگ نکروتیک شده بودند، از آزمون انکسین ۵-پروپیدیوم یادايد استفاده شد. آنالیز این آزمون نشان‌دهنده افزایش درصد سلول‌های آپوپتویک در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل بود [۱۵]. نتایج تمامی این مطالعات با نتایج پژوهش حاضر همسو می‌باشد و نشان دهنده اثرات مهاری نانوذرات نقره بر روند رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و نیز توانایی القای آپوپتوز در سلول‌ها توسط این نانوذرات می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه آزمایشگاهی نشان داد که نانوذرات نقره با پوشش عصاره برگ‌های گیاه آویشن شیرازی می‌توانند رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی رده HepG2 را متوقف نموده و باعث القای آپوپتوز در این سلول‌ها شوند. لذا، کاربرد این نانوذرات می‌تواند در مطالعات مربوط به درمان سرطان کبد مفید واقع شود.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه همکاران محترم مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد که در اجرای این طرح با کد مصوب ۱۱۱۳۰۵۱۷۹۳۲۰۰۶ همکاری داشتند تشکر می‌شود.

کند. در نتیجه سلول‌های دارای هسته یکنواخت و سبز رنگ نشان دهنده سلول‌های زنده هستند، در حالی که سلول‌های دارای هسته‌های زرد رنگ، نمایانگر آپوپتوز اولیه می‌باشند و سلول‌هایی که در مرحله آپوپتوز ثانویه هستند، دارای هسته قطعه قطعه شده و رنگ نارنجی تیره تا قرمز می‌باشند [۳۲،۳۱]. همان‌طور که در این پژوهش مشاهده کردیم سلول‌ها پس از تیمار با نانوذرات نقره به رنگ‌های زرد و نارنجی درآمده بودند که این امر نشان دهنده این است که مرگ القا شده در این سلول‌ها از نوع آپوپتوزیس می‌باشد. نتایج آزمون انکسین ۵-پروپیدیوم یادايد نشان دهنده توانایی القای آپوپتوز توسط نانوذرات نقره در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۴۰ میکروگرم بر لیتر و بعد از گذشت ۲۴ ساعت بود. تفسیر نمودار نشان داد درحالی که سلول‌های گروه کنترل در حدود ۹۵ درصد زنده هستند، سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره دچار آپوپتوز شده و در حدود ۳۴ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوز ثانویه شده‌اند. تمامی نتایج حاصل از این مطالعه باهم سازگاری دارد و نشان دهنده اثرات مهاری نانوذرات نقره در سلول‌های سرطانی رده HepG2 می‌باشد. Faedmaleki همکاران اثرات سمیت نانوذرات نقره را بر سلول‌های سرطانی رده HepG2 و سلول‌های طبیعی (سلول‌های اولیه کبد موش) بررسی کردند و دریافتند که نانوذرات نقره ۴۴ برابر بیشتر اثر مهار کنندگی بر روی رشد سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی دارد که این می‌تواند مربوط به اثرگذاری نانوذرات نقره بر روی سیستم اکسیداسیون سلول باشد و با توجه به اینکه فعالیت تنفسی میتوکندریال در سلول‌های رده سرطانی HepG2 بیشتر از سلول‌های سالم است، آنها بیان کردند که استفاده از نانوذرات نقره می‌تواند یک روش بالقوه برای درمان سرطان باشد [۳۴]. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان دهنده اثرات مهاری نانوذرات نقره بر روند رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی Rde HepG2 بود. Baharara و همکاران اثرات نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گل‌های بومادران (Achillea biebersteinii) را در القای مرگ سلولی در سلول‌های رده MCF-7 بررسی کردند. نتایج به دست آمده نشان داد که نانوذرات نقره به صورت وابسته به غلظت و زمان سبب مهار رشد و تکثیر سلول‌های رده MCF-7 می‌شوند. همچنین، برای بررسی تغییرات مورفوLOژیکی هسته در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره از روش رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. نتایج بررسی‌های مورفوLOژیکی نشان داد که نوکلئیک اسیدهای هسته بهوضوح تکه تکه شده‌اند که این امر نشانه ایجاد آپوپتوز در سلول‌های رده MCF-7 تیمار شده با نانوذرات نقره بود [۳۵]. نتایج حاصل از این پژوهش که نشان دهنده اثرات ضد تکثیری نانوذرات نقره می‌باشد، با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همسو می‌باشد.

**References:**

- [1] Govender R, Phulukdaree A, Gengan RM, Anand K, Chuturgoon AA. Silver nanoparticles of *Albizia adianthifolia*: the induction of apoptosis in human lung carcinoma cell line. *J Nanobiotechnology* 2013; 11(1): 1–9.
- [2] El Kassas HY, Attia AA. Bactericidal application and cytotoxic activity of biosynthesized silver nanoparticles with an extract of the red seaweed *Pterocladiella capillacea* on the HepG2 cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(3): 1299–1306.
- [3] Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond)* 2010; 7: 1-22.
- [4] Jain M, Kasetty S, Khan S, Desai A. An Insight to Apoptosis. *J Res Pract Dent* 2014: 1-12.
- [5] Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(1): 238-59.
- [6] Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(6): 2129-2144.
- [7] Lee JS. Genomic profiling of liver cancer. *Genomics Inform* 2013; 11(4): 180-5.
- [8] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12): 2893-917.
- [9] Wei Z, Doria C, Liu Y. Targeted therapies in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Med Insights Oncol* 2013; 7: 87–102.
- [10] Heidary Shayesteh T, Khajavi F, Ghasemi H, Hossini Zijoud SM, Ranjbar A. Effects of silver nanoparticle (Ag NP) on oxidative stress, liver function in rat: hepatotoxic or hepatoprotective?. *Issues Biol Sci Pharmaceut Res* 2014; 2(5): 40-4.
- [11] Lee TY, Liu M, Huang L, Lue SI, Lin LC, Kwan AL, et al. Bioenergetic failure correlates with autophagy and apoptosis in rat liver following silver nanoparticle intraperitoneally administration. *Part Fibre Toxicol* 2013; 10(1): 1-13.
- [12] Amin M, Hameed S, Ali A, Anwar F, Shahid SA, Shakir I, et al. Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Structural Features and In Vivo and In Vitro Therapeutic Effects against *Helicobacter pylori* Induced Gastritis. *Bioinorg Chem Appl* 2014: 1-11.
- [13] Kennedy DC, Orts-Gil G, Lai CH, Müller L, Haase A, Luch A, et al. Carbohydrate functionalization of silver nanoparticles modulates cytotoxicity and cellular uptake. *J Nanobiotechnology* 2014; 12(1): 1–8.
- [14] Satyavani K, Gurudeeban S, Ramanathan T, Balasubramanian T. Toxicity study of silver nanoparticles synthesized from *Suaeda monoica* on Hep-2 cell line. *Avicenna J Med Biotechnol* 2012; 4(1): 35–9.
- [15] Hekmat A, Saboury AA, Divsalar A. The Effects of Silver Nanoparticles and Doxorubicin Combination on DNA Structure and Its Antiproliferative Effect Against T47D and MCF7 Cell Lines. *J Biomed Nanotechnol* 2012; 8(6): 968-82.
- [16] Gurunathan S, Raman J, Abd Malek SN, John PA, Vikineswary S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: A potential cytotoxic agent against breast cancer cells. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 4399–413.
- [17] Gurunathan S, Han JW, Kwon DN, Kim JH. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale Res Lett* 2014; 9(1): 1–17.
- [18] Nithya Deva Krupa A, Raghavan V. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Aegle marmelos* (Bael) Fruit Extract and Its Application to Prevent Adhesion of Bacteria: A Strategy to Control Microfouling. *Bioinorg Chem Appl* 2014: 1-8.
- [19] Baharara J, Namvar F, Mousavi M, Ramezani T, Mohamad R. Anti-Angiogenesis Effect of Biogenic Silver Nanoparticles Synthesized Using *Saliva Officinalis* on Chick Chorioalantoic Membrane (CAM). *Molecules* 2014; 19(9): 13498–508.
- [20] Khodayar MJ, Taherzadeh E, Siahpoosh A, Mansourzadeh Z, Tabatabaei SA. Thymus daenensis extract and essential oils effects on morphine withdrawal signs in mice. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2014; 9(3): 1-5.
- [21] Dehkordi HS, Mobarakeh HI, Khodadadi M, Khamesipour F, Dehkordi MJ, Namjoo A. Effect of zataria multiflora bosis alcoholic extract on some components of complement system and serum IgM in rat. *Adv Stud Biol* 2014; 6(2): 57-66
- [22] Sharififar F, Moshafi MH, Mansouri SH, Khodashenas M, Khoshnoodi M. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* 2007; 18(7): 800–5.
- [23] Mata R, Nakkala JR, Sadras SR. Biogenic silver nanoparticles from *Abutilon indicum*: Their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects in vitro. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2015; 128: 276-86.
- [24] Zheng Q, Yang H, Wei J, Tong J long, Shu YQ. The role and mechanisms of nanoparticles to enhance radiosensitivity in hepatocellular cell. *Biomed Pharmacother* 2013; 67(6): 569-75.
- [25] Ortega FG, Fernández-Baldo MA, Fernández JG, Serrano MJ, Sanz MI, Diaz-Mochón JJ, et al. Study of antitumor activity in breast cell lines using silver nanoparticles produced by yeast. *Int J Nanomedicine* 2015; 10: 2021-31.

- [26] Vasanth K, Ilango K, MohanKumar R, Agrawal A, Dubey GP. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Anticancer activity of Moringa oleifera mediated silver nanoparticles on human cervical carcinoma cells by apoptosis induction. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2014; 117: 354-9.
- [27] Ho WY, Yeap SK, Ho CL, Rahim RA, Alitheen NB. Development of Multicellular Tumor Spheroid (MCTS) Culture from Breast Cancer Cell and a High Throughput Screening Method Using the MTT Assay. *PLoS One* 2012; 7(9): 1-7.
- [28] Al-Sheddi ES, Farshori NN, Al-Oqail MM, Musarrat J, Al-Khedhairy AA, Siddiqui MA. Portulaca oleracea Seed Oil Exerts Cytotoxic Effects on Human Liver Cancer (HepG2) and Human Lung Cancer (A-549) Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(8): 3383-7.
- [29] Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 1995; 70(5): 220-33.
- [30] Biancardi A, Biver T, Secco F, Mennucci B. An investigation of the photophysical properties of minor groove bound and intercalated DAPI through quantum-mechanical and spectroscopic tools. *Phys Chem Chem Phys* 2013; 15(13): 4596-603.
- [31] Karimian H, Mohan S, Moghadamtousi SZ, Fadaeinab M, Razavi M, Arya A, et al. Tanacetum polycephalum (L.) schultz-bip. Induces mitochondrial-mediated apoptosis and inhibits migration and invasion in MCF7 cells. *Molecules* 2014; 19(7): 9478–501.
- [32] Subramani T, Yeap SK, Ho WY, Ho CL, Omar AR, Aziz SA, et al. Vitamin C suppresses cell death in MCF-7 human breast cancer cells induced by tamoxifen. *J Cell Mol Med* 2014; 18(2): 305–313.
- [33] Rosenbaum S, Kreft S, Etich J, Frie C, Stermann J, Grskovic I, et al. Identification of novel binding partners (annexins) for the cell death signal phosphatidylserine and definition of their recognition motif. *J Biol Chem* 2011; 286(7): 5708–16.
- [34] Faedmaleki F, H Shirazi F, Salarian AA, Ahmadi Ashtiani H, Rastegar H. Toxicity Effect of Silver Nanoparticles on Mice Liver Primary Cell Culture and HepG2 Cell Line. *Iran J Pharm Res* 2014; 13(1): 235–242.
- [35] Baharara J, Namvar F, Ramezani T, Mousavi M, Mohamad R. Silver Nanoparticles Biosynthesized Using Achillea biebersteinii Flower Extract: Apoptosis Induction in MCF-7 Cells via Caspase Activation and Regulation of Bax and Bcl-2 Gene Expression. *Molecules* 2015; 20(2): 2693–706.
- [36] Ciftci H, Türk M, Tamer U, Karahan S, Menemen Y. Silver nanoparticles: Cytotoxic, apoptotic, and necrotic effects on MCF-7 cells. *Turk J Biol* 2013; 37(5): 573–81.